

氏名（本籍）	たつの さとる 竜野 暁（長野県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	論博第 369 号
学位授与の日付	令和 2 年 7 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	植物由来配糖体の構造と腫瘍細胞毒性に関する研究
論文審査委員	（主査）教授 三巻 祥浩 教授 一柳 幸生 教授 柳田 顕郎 教授 早川 磨紀男

論文内容の要旨

悪性腫瘍の薬物療法には、細胞障害性抗悪性腫瘍薬が 1960 年代から用いられ、2000 年代以降には分子標的薬が登場し、日々進歩を続けている。しかし、悪性腫瘍は 40 年近くに渡って日本人の死因順位の第 1 位であり、腫瘍細胞の耐性獲得や副作用の発現などの課題も多く、さらなる治療薬の開発が必要とされている。天然物には未知の構造を有する化合物や強力な生物活性を有する化合物が発見される可能性があり、天然物は現在でも新規悪性腫瘍治療薬シーズのスクリーニングソースとして有用であると考えられる。事実、アメリカ食品医薬品局（Food and Drug Administration, FDA）において 1981 年から 2014 年の間に認可された抗悪性腫瘍薬のうち、約 32% が天然物由来の化合物およびその誘導体である。

以上のような背景に基づき、申請者は臨床における悪性腫瘍薬物療法の向上に資する新規治療薬シーズの探索を目的に、4 種の植物の配糖体成分に着目した成分探索を行った。その結果、新規 24 種を含む 69 種の化合物を単離し、それらの構造を明らかにした。さらに、単離された化合物の HL-60 ヒト白血病細胞および A549 ヒト肺がん細胞に対する腫瘍細胞毒性を評価した。また、強い腫瘍細胞毒性を示した化合物のアポトーシス誘導活性を評価した。

第 1 章 ガガイモ科 *Marsdenia cundurango* 樹皮の化学成分

M. cundurango 樹皮の MeOH 抽出エキスを Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィー（CC）に付し、30% MeOH, 50% MeOH, MeOH, EtOH, EtOAc で溶出した。これらのうち、TLC において配糖体成分が確認された MeOH 溶出画分の成分探索を行い、新規 7 種（1–7）を含む 15 種の pregnane 配糖体（1–15）を単離した（Figure 1）。

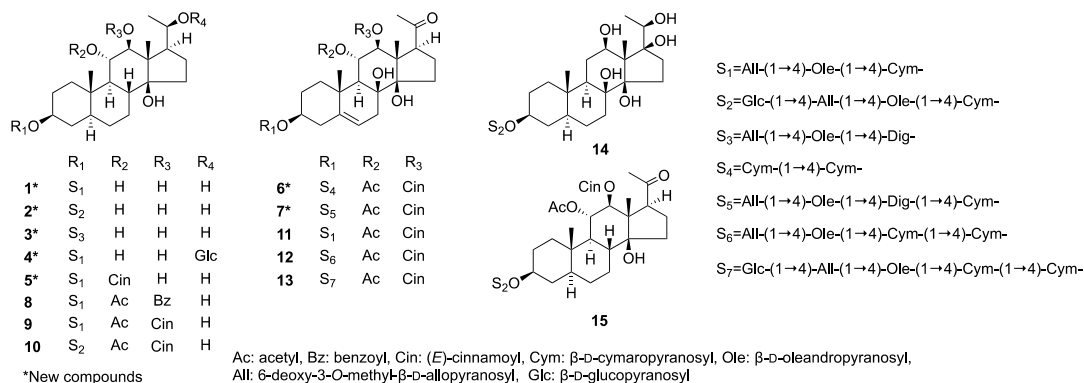


Figure 1. Structures of 1–15

第2章 キョウチクトウ科 *Thevetia neriifolia* 種子の化学成分

T. neriifolia 種子の MeOH 抽出エキスを Diaion HP-20 CC に付し, 20% MeOH, EtOH, EtOAc で溶出した. これらのうち, EtOH 溶出画分について配糖体成分に着目した成分探索を行い, 新規 1 種 (23) を含む 24 種の cardenolide 配糖体 (16–39) を単離した (Figure 2).

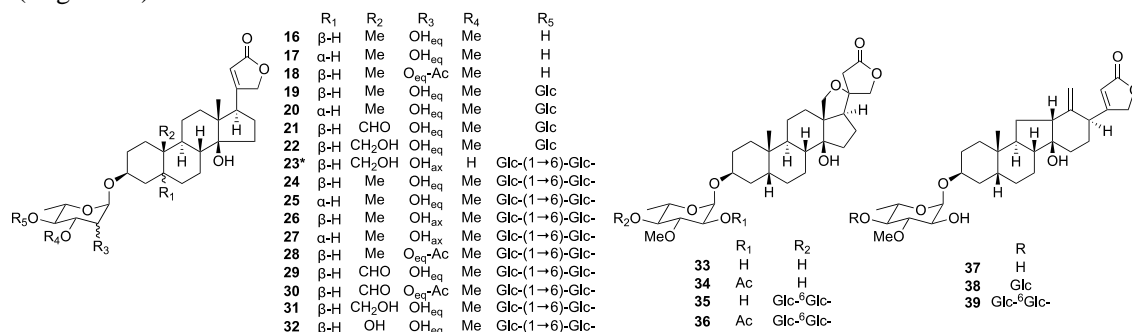


Figure 2. Structures of 16–39

第3章 リュウゼツラン科 *Yucca glauca* 地下部の化学成分

Y. glauca 地下部の MeOH 抽出エキスを Diaion HP-20 CC に付し, 30% MeOH, 50% MeOH, MeOH, EtOH, EtOAc で溶出した. これらのうち, MeOH 溶出画分について配糖体成分に着目した成分探索を行い, 新規 5 種 (40–44) を含む 12 種の spirostan 配糖体 (40–51) と, 新規 1 種 (52) を含む 8 種の furostan 配糖体 (52–59) を単離した (Figure 3).

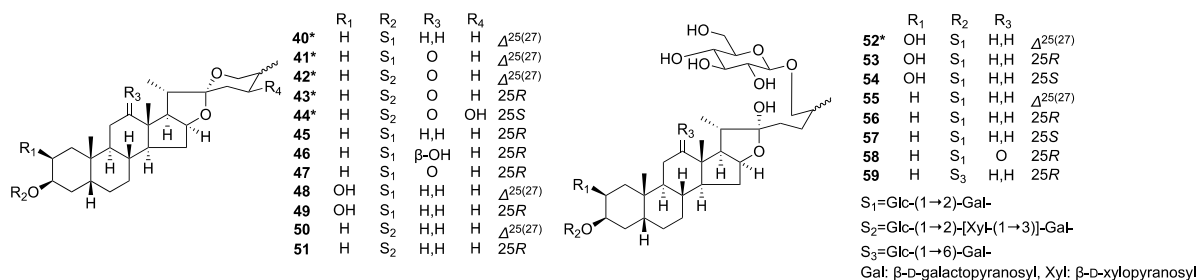


Figure 3. Structures of 40–59

第 4 章 マメ科 *Stryphnodendron fissuratum* 果皮の化学成分

S. fissuratum 果皮の EtOH 抽出エキスを BuOH で分配後, Diaion HP-20 CC に付し, 20% MeOH, 40% MeOH, 60% MeOH, 80% MeOH, MeOH, EtOH, EtOAc で溶出した. これらのうち, 60% MeOH 溶出画分と 80% MeOH 溶出画分について配糖体成分に着目した成分探索を行い, 10 種の新規 triterpene 配糖体 (**60–69**) を単離した (Figure 4).

化合物 **64**, **67–69** は 5–7 個の糖を有する新規 oleanane 型トリテルペン配糖体であり, その糖鎖構造を以下の手順により明らかにした. まず, 1D-selective-TOCSY スペクトルにより, 各アノマープロトン照射し, 各糖のサブスペクトルを抽出後, ^1H - ^1H COSY, HSQC, HSQC-TOCSY スペクトルの解析により, 各糖のすべてのプロトンの化学シフトとスピン結合定数 (J 値), 炭素シグナルの化学シフトを帰属した. その後, HMBC スペクトルにより, 各アノマープロトンシグナルから結合先の炭素シグナルへの遠隔相関を観測し, 糖の結合関係を明らかにした. 化合物 **63–69** の末端 α -L-arabinosyl 基は, 通常の $^4\text{C}_1$ 型配座ではなく $^1\text{C}_4$ 型配座をとっていることを, ^1H -および ^{13}C -NMR スペクトルの化学シフト値, アノマーの $^1J_{\text{C-H}}$ 値 (166 Hz), HMBC スペクトルにおけるアノマープロトンから C-3 位炭素と C-5 位炭素への強い遠隔相関により確認した (Figure 4).

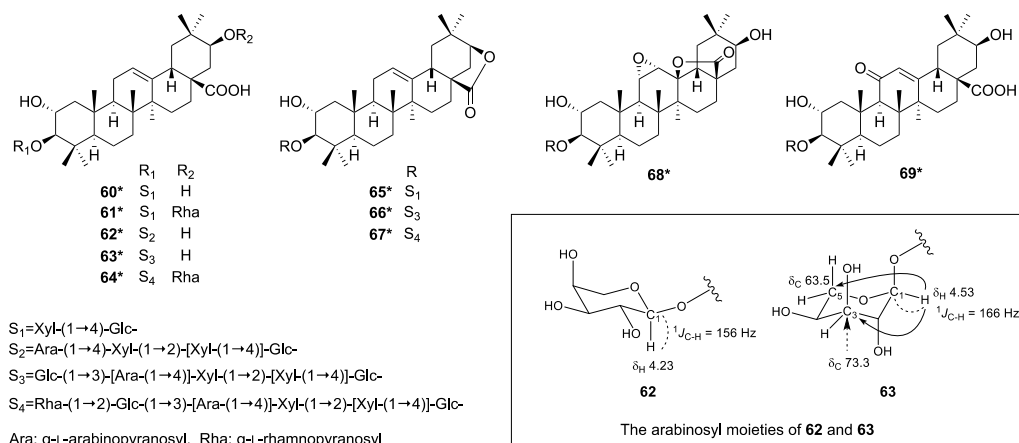


Figure 4. Structures of **60–69**

第 5 章 腫瘍細胞に対する細胞毒性

化合物 **1–69** について, HL-60 細胞および A549 細胞に対する腫瘍細胞毒性を MTT 法により評価した. その結果, pregnane 配糖体 (**5–7**, **11**, **12**), cardenolide 配糖体 (**16–39**), spirostan 配糖体 (**40**, **45**, **51**), furostan 配糖体 (**55–57**) は, HL-60 細胞と A549 細胞の両者に対して腫瘍細胞毒性を示した. Triterpene 配糖体 (**60–69**) は, いずれの化合物も顕著な腫瘍細胞毒性を示さなかった (Table 1).

化合物 **12** は, アグリコンの 3 位に 4 個の deoxy 糖からなる糖鎖が結合した pregnane 配糖体であり, 比較的強い腫瘍細胞毒性を示したが (HL-60: IC₅₀ 3.8 μM ,

A549: IC₅₀ 12.8 μ M), その糖鎖の末端に β -D-glucopyranosyl 基が結合すると (**13**), 腫瘍細胞毒性は減弱した. 化合物 **16** は cardenolide 配糖体であるが, 今回単離した化合物のなかで最も強い腫瘍細胞毒性を示した (HL-60: IC₅₀ 0.0050 μ M, A549: IC₅₀ 0.0055 μ M). Cardenolide 配糖体では, アグリコンの A/B 環の結合様式が *trans* 体 (H-5 α) よりも, *cis* 体 (H-5 β) の方が強い腫瘍細胞毒性を示した. また, 18 位と 20 位間でエーテル環を形成すること, C 環と D 環が C-nor-D-homo 型になること, 3 位水酸基の糖鎖が延長することで腫瘍細胞毒性はいずれも減弱することが明らかとなった. 化合物 **40** と **55**, **45** と **56** は, それぞれ同じ糖鎖構造を有する spirostan および furostan 配糖体であり, ほぼ同程度の腫瘍細胞毒性を示した.

Table 1. Cytotoxic activities of **1**–**69**, etoposide, and cisplatin against HL-60 and A549 cells

Compound	IC ₅₀ (μ M)		Compound	IC ₅₀ (μ M)		Compound	IC ₅₀ (μ M)	
	HL-60	A549		HL-60	A549		HL-60	A549
1	>20	>20	25	5.6	2.8	49	11.3	>20
2	>20	>20	26	0.58	0.38	50	4.9	6.0
3	>20	>20	27	1.9	1.1	51	4.2	5.9
4	>20	>20	28	1.0	0.76	52	13.3	>20
5	4.2	12.2	29	0.66	0.53	53	17.8	>20
6	4.6	15.7	30	0.82	0.73	54	9.2	>20
7	5.6	16.3	31	1.7	1.7	55	4.4	11.9
8	14.1	>20	32	11.6	12.0	56	3.7	7.0
9	8.4	>20	33	0.081	0.22	57	3.3	9.3
10	>20	>20	34	0.21	0.16	58	>20	>20
11	6.1	16.9	35	2.8	2.5	59	14.3	>20
12	3.8	12.8	36	1.9	1.6	60	>20	>20
13	>20	>20	37	14.7	11.0	61	>20	>20
14	>20	>20	38	0.40	0.27	62	>20	>20
15	>20	>20	39	3.8	2.3	63	>20	>20
16	0.0050	0.0055	40	2.5	7.3	64	>20	>20
17	0.031	0.036	41	>20	>20	65	>20	>20
18	0.019	0.026	42	>20	>20	66	>20	>20
19	0.050	0.069	43	>20	>20	67	>20	>20
20	0.48	0.23	44	>20	>20	68	>20	>20
21	0.065	0.035	45	3.1	8.4	69	>20	>20
22	0.57	0.57	46	>20	>20			
23	1.8	1.4	47	>20	>20	Etoposide	0.73	14.3
24	0.47	0.20	48	5.0	>20	Cisplatin	1.7	5.1

単離された化合物のうち, HL-60 細胞に対して比較的強い細胞毒性を示した pregnane 配糖体 **6**, cardenolide 配糖体 **16**, spirostan 配糖体 **40**, furostan 配糖体 **55** のアポトーシス誘導活性を検討した. 化合物 **6**, **16**, **40**, **55** でそれぞれ処理した HL-60 細胞において, 核クロマチンの凝集, sub-G1 期の細胞数の上昇, caspase-3 の活性化が認められたことより, **6**, **16**, **40**, **55** は HL-60 細胞に対していずれもアポトーシスを誘導することが示された. これらのうち, **40** で処理した HL-60 細胞には, caspase-8 と caspase-9 の有意な活性化と, ミトコンドリア膜電位の消失が認められたことから, **40** は細胞膜表面に存在する death receptor を介し, ミトコンドリア経路によりアポトーシスを誘導する可能性が示唆された (Figure 5). 化合物 **6**, **16**, **40**, **55** は, いずれも植物由来の配糖体であるが, アポトーシスの誘導経路が異なることが示唆された.

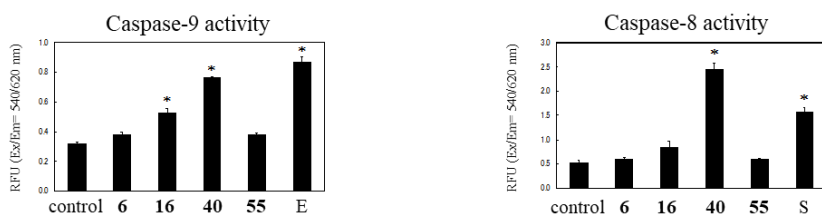


Figure 5. Results of (A) caspase-9 and (B) caspase-8 activity assays in the HL-60 cells treated with with **6**, **16**, **40**, **55**, etoposide (E), or staurosporine (S)

HL-60 cells were treated with either 23 μM of **6**, 0.025 μM of **16**, 12.5 μM of **40**, 22 μM of **55**, 15 μM of etoposide (E), or 1.0 μM of staurosporine (S) for 24 h (A) or 6 h (B). The data are presented as the mean \pm S.E.M. of three experiments. (* $p < 0.001$ vs. the control group readings)

化合物 **6**, **16**, **40**, **55** の, TIG-3 ヒト肺正常線維芽細胞に対する細胞毒性を評価したところ, **6** が HL-60 細胞に対して腫瘍細胞選択的な細胞毒性を示した. 一方, **16**, **40**, **55** は, 腫瘍細胞選択性を示さなかった. また, cardenolide 配糖体 **16** の腫瘍細胞毒性 (HL-60: IC_{50} 0.0050 μM , A549: IC_{50} 0.0055 μM) と Na^+/K^+ ATPase 阻害活性 (IC_{50} 0.79 μM) の相関を評価した結果, HL-60 および A549 細胞に対する腫瘍細胞毒性と Na^+/K^+ ATPase 阻害活性との間に相関は認められなかったことから, **16** は Na^+/K^+ ATPase 阻害作用とは別の機構で腫瘍細胞を傷害する可能性が示唆された.

総括

新規悪性腫瘍治療薬シーズの探索を目的に, 4 種の植物について配糖体に着目した成分研究を行い, 新規 24 種を含む 69 種の配糖体を単離し, 化学構造を明らかにした. 単離された化合物の腫瘍細胞毒性とアポトーシス誘導活性, ヒト正常肺線維芽細胞に対する細胞毒性, Na^+/K^+ ATPase の阻害作用を評価することにより, pregnane 配糖体 **6** と cardenolide 配糖体 **16** は, 新規悪性腫瘍治療薬シーズとして期待できる天然物であると考えられた.

研究成果の掲載誌

1) *J. Nat. Med.*, **73**, 93-103 (2019); 2) *Nat. Prod. Res.*, **Jan 22**, 1-6 (2020), doi: 10.1080/14786419.2020.1716352; 3) *Phytochemistry*, **101**, 109-115 (2014); 4) *Carbohydr. Res.*, **434**, 18-26 (2016)

論文審査の結果の要旨

本論文は、臨床における悪性腫瘍薬物療法の向上に資する新規治療薬シーズの探索を目的に、4種の植物の配糖体成分に着目した成分探索を行い、新規24種を含む69種の配糖体の化学構造を明らかにするとともに、単離された化合物のHL-60ヒト白血病細胞およびA549ヒト肺がん細胞に対する腫瘍細胞毒性について論述したものである。

第1章では、ガガイモ科 *Marsdenia cundurango* 樹皮の化学成分について述べた。*M. cundurango* 樹皮の MeOH 抽出エキスを Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィー (CC) に付し、30% MeOH, 50% MeOH, MeOH, EtOH, EtOAc で溶出した。これらのうち、TLC において配糖体成分が確認された MeOH 溶出画分の成分探索を行い、新規7種 (1-7) を含む15種の pregnane 配糖体 (1-15) を単離・同定した。

第2章では、キョウチクトウ科 *Thevetia neriifolia* 種子の化学成分について述べた。*T. neriifolia* 種子の MeOH 抽出エキスを Diaion HP-20 CC に付し、20% MeOH, EtOH, EtOAc で溶出した。これらのうち、EtOH 溶出画分について配糖体成分に着目した成分探索を行い、新規1種 (23) を含む24種の cardenolide 配糖体 (16-39) を単離・同定した。

第3章では、リュウゼツラン科 *Yucca glauca* 地下部の化学成分について述べた。*Y. glauca* 地下部の MeOH 抽出エキスを Diaion HP-20 CC に付し、30% MeOH, 50% MeOH, MeOH, EtOH, EtOAc で溶出した。これらのうち、MeOH 溶出画分について配糖体成分に着目した成分探索を行い、新規5種 (40-44) を含む12種の spirostan 配糖体 (40-51) と、新規1種 (52) を含む8種の furostan 配糖体 (52-59) を単離・同定した。

第4章では、マメ科 *Stryphnodendron fissuratum* 果皮の化学成分について述べた。*S. fissuratum* 果皮の EtOH 抽出エキスを BuOH で分配後、Diaion HP-20 CC に付し、20% MeOH, 40% MeOH, 60% MeOH, 80% MeOH, MeOH, EtOH, EtOAc で溶出した。これらのうち、60% MeOH 溶出画分と 80% MeOH 溶出画分について配糖体成分に着目した成分探索を行い、10種の新規 triterpene 配糖体 (60-69) を単離・同定した。

第5章では、単離された配糖体の腫瘍細胞毒性について述べた。まず、上記4種の植物より単離された計69種の配糖体について、HL-60細胞とA549細胞に対する腫瘍細胞毒性をMTT法により評価し、5種の pregnane 配糖体、24種の cardenolide 配糖体、4種の spirostan 配糖体、3種の furostan 配糖体が HL-60細胞とA549細胞の両者に対して細胞毒性を示すことを明らかにした。これらの結果を考察し、いくつかの構造活性相関の知見を得た。次に、腫瘍細胞毒性を示した化合物のうち、pregnane 配糖体の 11 α -acetoxy-12 β -[((*E*)-cinnamoyl)oxy]-8 β ,14 β -dihydroxy-20-oxopregn-5-en-3 β -yl *O*- β -D-cymaropyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-cymaropyranoside (6), cardenolide 配糖体の digitoxigenin 3-*O*- α -L-thevetopyranoside (neriifolin) (16), spirostan 配糖体の 5 β -spirost-25(27)-en-3 β -yl *O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranoside (40), furostan 配糖体の 26-[(β -D-glucopyranosyl)oxy]-22 α -hydroxy-5 β -furost-25(27)-en-3 β -yl *O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranoside (55) の HL-60細胞に対するアポトーシス誘導活性を、核クロマチンの凝集、sub-G1期の細胞数の上昇、caspase-3の活性化により確認し、いずれの化合物も HL-60細胞に対してアポトーシスを誘導することを明らかにした。これらのうち、40で処理したHL-60細胞には、caspase-8とcaspase-9の有意な活性化と、ミトコンドリア膜電位の消失が認められたことから、40はHL-60細胞に対して細胞膜表面

に存在する death receptor を介し、ミトコンドリア経路によりアポトーシスを誘導する可能性が示唆された。さらに、**6**, **16**, **40**, **55** の TIG-3 ヒト正常肺線維芽細胞に対する細胞毒性を評価したところ、**6** のみが HL-60 細胞に対して腫瘍細胞選択的な細胞毒性を示すことを見出した。また、cardenolide 配糖体 **16** の腫瘍細胞毒性と Na^+, K^+ -ATPase 阻害活性の相関を評価した結果、 Na^+, K^+ -ATPase 阻害活性と、HL-60 および A549 細胞に対する腫瘍細胞毒性との間に相関が認められなかったことから、**16** は Na^+, K^+ -ATPase の阻害作用とは別の機構で腫瘍細胞を傷害する可能性が示唆された。

以上、4 種の植物から新規 24 種を含む 69 種の配糖体の化学構造を明らかにし、それらの腫瘍細胞毒性とアポトーシス誘導活性、ヒト正常肺線維芽細胞に対する細胞毒性、 Na^+, K^+ -ATPase の阻害作用を評価することにより、新規抗悪性腫瘍薬シーズとして、2 種の配糖体 **6**, **16** を見出した。したがって、本申請論文は、博士（薬学）の学位論文として相応しいものと判断する。